

Untersuchungen über die Fettsäuresynthese
bei *Phycomyces Blakesleeana* mit Hilfe von ^{14}C -Acetat
und einer neuen papierchromatographischen Methode
zur quantitativen Fettsäurebestimmung

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von
LEO ABISCH
staatenlos

Druck : J. H. Schoch & Co. Ostermundigen, 1956



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548827_0003

Untersuchungen über die Fettsäuresynthese
bei *Phycomyces Blakesleeana* mit Hilfe von ^{14}C -Acetat
und einer neuen papierchromatographischen Methode
zur quantitativen Fettsäurebestimmung

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von
LEO ABISCH
staatenlos

Druck : J. H. Schoch & Co. Ostermundigen, 1956

Genehmigt von der Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
auf Antrag der

Herren Professoren K. BERNHARD und T. REICHSTEIN

Basel, den 6. Dezember 1955

L. VONDERSCHMITT
Dekan

MEINEN LIEBEN ELTERN
IN DANKBARKEIT GEWIDMET

Herrn Prof. Dr. K. BERNHARD

möchte ich auch an dieser Stelle für seine wertvollen Ratschläge und für sein ständiges Interesse an meiner Arbeit meinen besten Dank aussprechen.



INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung und Problemstellung	7
II. Zur Papierchromatographie der Fettsäuren	9
III. Verfahren zur papierchromatographischen Trennung gesättigter und ungesättigter Fettsäuren mit 12 – 22 C-Atomen	14
IV. Züchtung des Schimmelpilzes <i>Phycomyces Blakesleeanus</i> in ^{14}C -acetathaltiger Nährlösung	21
V. Chemische Zusammensetzung der Pilzfettsäuren	26
VI. Auswertung der Papierchromatogramme hinsichtlich der Radioaktivität einzelner Fettsäureflecken	32
VII. Signierungsversuch mit ^{14}C -Formiat	44
VIII. Diskussion der Ergebnisse	46
IX. Zusammenfassung	49
X. Literaturverzeichnis	51

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Synthese und Abbau der Fettsäuren haben die biochemische Forschung in den letzten Jahren vielfach beschäftigt. *Bernhard*¹ bewies 1940 unter Heranziehung der Isotopentechnik erstmalig die Beteiligung der allgemein als stoffwechselinert betrachteten Essigsäure an im Tierkörper sich abspielenden Acetylierungen. *Bloch* und *Rittenberg*² und *Rittenberg* und *Bloch*³ zeigten in der Folge, dass sowohl Fettsäuren als auch Cholesterin in vivo aus diesem C₂-Bruchstück aufgebaut werden. In neuester Zeit charakterisierten *Lipmann*⁴ und *Lynen*⁵ die sog. aktive Essigsäure als acetyliertes Coenzym A.

Über die Entstehung ungesättigter Fettsäuren existieren zahlreiche Vorstellungen und Hypothesen, die, was die pflanzlichen Organismen betrifft, von *Hilditch*⁶ zusammengefasst wurden. Es wird zumeist angenommen, die Bildung der ungesättigten Säuren erfolge vor derjenigen der gesättigten und verlaufe prinzipiell verschieden. Die höher ungesättigten Verbindungen wie Linolen- und Linolsäure sollen die «precursors» der Ölsäure darstellen. Experimentelle Beweise sind vorerst spärlich. Man darf wohl annehmen, in einer Zelle tierischen oder pflanzlichen Ursprunges entstünden nicht alle in ihr nachweisbaren Fettsäuren gleichzeitig und in analogem Ausmasse. *Simmons* und *Quackenbush*⁷ haben kürzlich über Fettsäurebildungen bei wachsenden Soyabohnen berichtet. Etwa 30 – 40 Tage nach erfolgter Blüte wurden geeignete Sprösslinge in Nährlösungen, enthaltend radioaktive Glucose, verpflanzt und nach einer gewissen Zeit (0 – 21 Stunden, 2 – 8 Tage etc.) aus den Schoten die Soyabohnen und daraus die Fettsäuren gewonnen. Aus dem Gemisch letzterer isolierten die Autoren über die 2,4-Dinitrobenzolsulfonylchlorid-Derivate die Einzelkomponenten und bestimmten deren Radioaktivität. Am stärksten aktiv war die Ölsäure, bedeutend geringer die Linol-

und Linolensäure. Es wurde daraus geschlossen, dass offenbar zuerst Die Ölsäure und dann daraus die Linol- und Linolensäure entstehen.

Bernhard und Albrecht⁸ haben in früheren Untersuchungen die Lipidbildungen eines Schimmelpilzes *Phycomyces Blakesleeanus* untersucht und dabei festgestellt, dass dessen Mycel wechselnde Mengen eines vielseitig zusammengesetzten Fettes aufweist. In einer schweres Wasser enthaltenden Nährlösung gezüchtet⁹, bildete der Pilz deuteriumhaltige Fettsäuren von ähnlichem D-Gehalt im Gegensatz zu den Befunden der Tierversuche, wo die Linolsäure stets deuteriumfrei war.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Absicht unternommen, diese synthetischen Leistungen näher zu verfolgen. Durch Zugabe kleiner Mengen radioaktiven Acetates zur Nährlösung im Zeitpunkt des Beginnes oder des bereits fortschreitenden Wachstums durfte eine «Signierung» der entstehenden Fettsäuren erwartet werden. Die sich ergebenden Aktivitäten derselben müssten für die einzelnen Fettsäuren verschieden ausfallen, wenn dieselben nicht gleichzeitig und im gleichen Ausmasse in der Zelle entstünden. Es schien somit durchaus denkbar, durch solche Versuche Einblicke in die Sequenz der Fettsäurebildung bei diesem Pilz zu erhalten. Der Nachweis derartiger Unterschiede setzte indessen eine einwandfreie chemische Trennung der einzelnen Fettsäuren voraus, denn nur auf einer solchen Grundlage konnten die Aktivitätsmessungen zu verwertbaren Ergebnissen führen. Im Hinblick auf die erwünschte Acetatzugabe nicht nur vor Beginn, sondern auch während des Pilzwachstums mussten Reihenuntersuchungen geplant werden, die wir indessen nur dann durchführen konnten, wenn es gelang, auch sehr kleine Fettsäuremengen einwandfrei zu trennen.

In den letzten Jahren wurden verschiedentlich Verfahren zur chromatographischen Fettsäurentrennung vorgeschlagen, die sich indessen nicht bewährten. Die Inangriffnahme der Erforschung der Fettsäurebildung aus Acetat durch *Phycomyces Blakesleeanus* war somit an die Ausarbeitung einer brauchbaren papierchromatographischen Trennungsmethode für kleinste Fettsäuremengen gebunden.

II. ZUR PAPIERCHROMATOGRAPHIE DER FETTSÄUREN

Zur papierchromatographischen Analyse mehrerer Substanzen benötigt man ein Lösungsmittelsystem, das aus einer mobilen und einer immobilen Phase besteht, die nur beschränkt miteinander mischbar sein dürfen. Die zu trennenden Substanzen müssen in beiden Phasen ungefähr gleich gut löslich sein, sonst wandern sie auf dem Papier entweder gar nicht oder mit der Front der mobilen Phase. Um eine Trennung mehrerer Substanzen zu erreichen, müssen sich deren Verteilungskoeffizienten in den verwendeten Lösungsmitteln genügend unterscheiden.

Bei den *niedrigeren Fettsäuren* (bis etwa C_{10}) sind die gestellten Anforderungen verhältnismässig leicht zu erfüllen, und es existieren zahlreiche einfache Methoden zur papierchromatographischen Trennung dieser Substanzen, wobei meistens wässrige Alkohole unter Zusatz von Ammoniumhydroxyd oder Essigsäure als mobile Phase dienen. Bei den *höheren Fettsäuren* ergeben sich Schwierigkeiten, da mit zunehmender Kettenlänge sowohl die Löslichkeit in den polaren Lösungsmitteln als auch die Unterschiede der Verteilungskoeffizienten zwischen benachbarten Gliedern einer homologen Reihe zu klein werden.

Bisher sind zwei prinzipielle Methoden angewendet worden, um diesen Schwierigkeiten zu begegnen: Die erste besteht in der Überführung der Fettsäuren in Derivate, die den gestellten Anforderungen genügen, während die zweite das gleiche Ziel durch Umkehrung der Phasen — mittels geeigneter Behandlung des Papiers — erreicht (Reversed-phase Chromatographie). Schliesslich können diese beiden Verfahren auch miteinander kombiniert werden. Die Behandlung des

Papiers bezweckt, dasselbe hydrophob zu machen, wodurch die weniger polare Phase, in der die Fettsäuren gut löslich sind, auf dem Papier fixiert wird. Sie können dadurch langsam mit der mobilen, polaren Phase — entsprechend ihrem Verteilungskoeffizienten — auf dem Papier wandern.

Im folgenden werden die Arbeitsvorschriften kurz angegeben, die bisher auf dem Gebiet der Papierchromatographie höherer Fettsäuren empfohlen wurden :

1. Chromatographie freier Fettsäuren auf unbehandeltem Papier

Unter Verwendung wässriger Alkohole in verschiedenen Konzentrationen gelang einer Reihe von Autoren ¹⁰⁻¹⁵ die Trennung von jeweils zwei Fettsäuren. Nach Spiteri und Nunez ¹⁶ ist dieses Verfahren jedoch unzulänglich.

2. Chromatographie von Fettsäurederivaten auf unbehandeltem Papier

Die Hydroxamsäuren weisen gegenüber den freien Fettsäuren bessere Löslichkeitseigenschaften auf und können — unter Verwendung von Butanol und Eisessig als mobile Phase — gut voneinander getrennt werden. Zudem sind die Hydroxamsäuren farbige Verbindungen, womit eine zusätzliche Sichtbarmachung der Säureflecken überflüssig wird. Darstellung, Papierchromatographie, Rf-Werte und Farben einer Reihe von Hydroxamsäuren wurden eingehend beschrieben ¹⁷⁻²⁰.

3. Chromatographie von Fettsäuren auf vorbehandeltem Papier

Wie bereits erwähnt, besteht der Zweck der Papiervorbehandlung darin, die Phasenverhältnisse umzukehren, d. h. die weniger polare Phase auf dem Papier zu fixieren. Die zur Imprägnierung verwendete Substanz wird dabei meistens gelöst und das Papier in diese Lösung eingetaucht, darauf das Lösungsmittel durch Verdunsten entfernt. Für eine gute Trennung und für die Reproduzierbarkeit der Resultate ist es von grosser Wichtigkeit, dass die Imprägnierung möglichst gleichmässig erfolgt und gewichtsmässig kontrolliert wird. Erfolgt z. B. die Trocknung durch vertikales Aufhängen des Papiers, so ist eine

Anreicherung des Imprägnierungsmittels im unteren Teil des Bogens zu befürchten. Manche Autoren²¹ weisen darauf hin, dass, um Misserfolge zu vermeiden, stets mehrere Bogen Papier gleichzeitig behandelt werden müssen.

a) *Reversed-phase Chromatographie der freien Fettsäuren*

Mehrfach werden als Imprägnierungsmittel *Triglyceride* (Öle) empfohlen und so Fettsäuren bis zu C_{26} getrennt^{22, 23}. Nach einer ähnlich arbeitenden Methode – mit wässrigem Äthanol als mobile Phase – werden gesättigte und ungesättigte Fettsäuren bis zu C_{18} separiert^{16, 24, 25}. Auch *Parafinöl* eignet sich zur Behandlung des Papiers, womit ebenfalls durch Anwendung wässriger Alkohole Säuren bis zu C_{18} getrennt werden^{26, 27}. Durch Zugabe von 0,001 n HCl zum Alkohol²⁸ erstreckt sich der Anwendungsbereich auf Fettsäuren bis zu C_{24} . Die gleichen Autoren imprägnierten das Papier auch mit *Latex*. In Anlehnung an entsprechende Methoden der Säulenchromatographie wurde Papier mit *Silikagel* imprägniert und zur Trennung gesättigter Säuren ein Butanol-Benzol-Gemisch verwendet¹⁸. Auf Papier, das mit *Silikon* vorbehandelt war, gelang die Trennung gesättigter und ungesättigter Fettsäuren bis zu 18 C-Atomen²¹. Als mobile Phasen dienten dabei Aceton-Wasser und Cyclohexan-n-Hexan-Benzin. Analoge Erfolge wurden durch Behandlung des Papiers mit *Alaun* und Verwendung von Chloroform-Ammoniak-Methanol als Lösungsmittel²⁹ erzielt.

Schliesslich wurde auch die Verwendungsmöglichkeit von *Kohlenwasserstoffen* von nicht zu hohem Siedebereich erkannt: Behandlung des Papiers mit KW (140 – 170°) und Verwendung von Methanol-KW-Aceton als mobile Phase erlaubten Trennungen gesättigter und ungesättigter Fettsäuren bis zu C_{22} ^{19, 20}. Anderen Autoren diente eine etwas höher siedende KW-Fraktion (190 – 220°) und Alkohol-Wasser bzw. Eisessig-KW-Wasser als Lösungsmittel^{30, 31}, womit Trennung von gesättigten Fettsäuren bis zu C_{18} erzielt wurden.

b) *Reversed-phase Chromatographie von Fettsäurederivaten*

Auf einem mit *Triglyceriden* imprägnierten Papier konnten die *Br-J-Addukte* ungesättigter Fettsäuren getrennt werden²³. Die Rf-

Werte lagen dabei beträchtlich unter denjenigen der freien ungesättigten Säuren. Die etwas schwierig auszuführende Behandlung des Papiers mit *Kautschuk* ermöglichte die Chromatographie der *Aethylester* gesättigter Fettsäuren bis zu C_{18} mittels Methanol und Aceton³². Das gleiche Resultat wurde durch *Acetylierung* des Papiers und Verwendung der *Hydroxamsäuren* erzielt³³. Nach einer kürzlich publizierten Methode wird das Papier mit *Tetralin* und *Petroleum* imprägniert. Ungesättigte Fettsäuren bis zu C_{22} können in Form der *Quecksilberacetat-Additionsprodukte* ihrer Methyl-ester getrennt werden, wobei Methanol, Eisessig-Tetralin und Äthylenglykol-Eisessig-Tetralin als mobile Phase dienen³⁴.

4. Sichtbarmachung der Säureflecken

Da die Fettsäuren farblose Verbindungen sind, ist es erforderlich, nach der papierchromatographischen Trennung die Positionen der Säureflecken durch geeignete Reaktionen sichtbar zu machen. Eingehende Untersuchungen auf diesem Gebiet wurden von *H. P. Kaufmann* und Mit. durchgeführt, und eine grosse Zahl von Reagenzien und Verfahren wurden vorgeschlagen: Osmiumtetroxyd-Dämpfe, Kaliumpermanganat, radioaktives Jod und Cobalt, Metallsalze, Farbstoffe, organische Basen und Fluoreszenzfarben^{10, 12, 13, 31, 35-39}. Ferner wurden ein Schaumtest^{35, 36}, eine Methode zur Bestimmung der Jodzahl ungesättigter Fettsäuren auf dem Papier unter Verwendung von radioaktivem Jod³⁸ und schliesslich eine Anwendung der Retentionsanalyse zur quantitativen Bestimmung einzelner Fettsäuren³⁶ bekannt gegeben. Andere Autoren verwenden Silbersalze^{16, 22, 23, 24, 25}, Bromkresolgrün¹⁹, Permanganat und Kupferacetat²¹ und Diphenylcarbazon³⁴.

Tabelle 1

Methoden zur papierchromatographischen Trennung höherer Fettsäuren

Behandlung des Papiers	Behandlung der Säuren	Mobile Phase	Nachweis der Säuren	Anwendungsbereich	Autoren
Unbehandelt	Freie Säuren	Wässr. Alkohole	KMnO ₄ , OsO ₄ , Farbstoffe, Metallsalze	Gesättigte und ungesättigte bis C ₁₈ , nur paarweise	10 — 15
Unbehandelt	Freie Säuren	Wässr. Methanol	Silbersalze	Bis C ₁₈	16
Unbehandelt	Hydroxamsäuren	BuOH, Essigester	Farbe der Hydroxamsäuren	Gesättigte und ungesättigte bis C ₂₂	17 — 20
Triglyceride	Freie Säuren		Silbersalze	Bis C ₂₆	22, 23
Triglyceride	Freie Säuren	Wässr. Aethanol	Silbersalze	Gesättigte und ungesättigte bis C ₁₈	16, 24, 25
Paraffinöl	Freie Säuren	Wässr. Alkohole	Kupferacetat und K-Ferrocyanid	Bis C ₁₈	26, 27
Paraffinöl oder Latex	Freie Säuren	Wässr. Methanol + 0.001 n HCl	Indikatoren, Bleisalze	Bis C ₂₄	28
Silicagel	Freie Säuren	Butanol-Benzol		Gesättigte Fettsäuren	18
Silikon	Freie Säuren	Aceton-Wasser: Cyclohexan-Benzin-n-Hexan	Kupferacetat und Rhodamin B	Gesättigte und ungesättigte bis C ₁₈	21
Alaun	Freie Säuren	Chloroform-NH ₃ -Methanol	Rhodamin B	Bis C ₁₈	29
Kohlenwasserstoffe (140 — 170°)	Freie Säuren	Methanol-KW-Aceton	Bromkresolgrün	Gesättigte und ungesättigte bis C ₂₂	19, 20
Kohlenwasserstoffe (190 — 220°)	Freie Säuren	Wässr. Alkohol; AcOH-KW-Wasser	Kupfersalze	Gesättigte bis C ₁₈	30, 31
Kautschuk	Aethylester	Methanol, Aceton			
Acetylierung	Hydroxamsäuren		Farbstoffe	Gesättigte bis C ₁₈	32
Triglyceride	Br-J-Derivate der unges. Fettsäuren		Silbersalze	Bis C ₁₈	33
	Hg-Acetat-Additionsprod. d. unges. Fetts.	MeOH; AcOH-Tetralin; AcOH-Tetralin-Aethylenglykol		Bis C ₂₂	23
Tetralin + Petroleum			Diphenylcarbazon	Bis C ₂₂	34

III. VERFAHREN ZUR PAPIERCHROMATO- GRAPHISCHEN TRENNUNG GESÄTTIGTER UND UNGESÄTTIGTER FETTSÄUREN MIT 12 – 22 C - ATOMEN

Unseren Bedürfnissen konnte nur ein Verfahren entsprechen, das vor allem eine Trennung der ungesättigten Fettsäuren und zugleich auch eine quantitative Bestimmung erlaubte. Dieses Ziel wurde erreicht in Anlehnung an die Vorschläge von Kaufmann und Nitsch³¹ durch Verwendung einer Petrolätherfraktion vom Siedepunkt 190 – 226° zur Imprägnierung des Papiers und als stationäre Phase. Als mobile Phase diente 90%ige mit Petroläther gesättigte Essigsäure. Die Chromatographie wird absteigend vorgenommen bei einer temperaturabhängigen Laufzeit von 20 – 45 Stunden. Die Chromatogramme behandeln wir nach erfolgter Trocknung mit Kupferacetatlösung und darauf zur Umwandlung der Kupferseifen in braunrote Kupferrocyanidkomplexe mit verdünnter Kaliumferrocyanidlösung. Letztere sind lichtbeständig, und ihre Lichtabsorption kann mittels eines geeigneten Kolorimeters gemessen werden. Es gelingt auf diese Weise eine quantitative Analyse eines in Mengen von 100 – 400 γ auf das Papier aufgetragenen Fettsäuregemisches.

Ausführung

Chromatographie

500 ccm 90%ige Essigsäure werden bei der später – möglichst genau – einzuhaltenden Arbeitstemperatur mit 25 ccm KW geschüttelt. Nach vollständiger Trennung wird die untere Phase abgelassen und mit 20 ccm 90%iger Essigsäure versetzt, um die Sättigung geringfügig zu unterschreiten, damit bei kleinen Temperaturschwankungen keine

Entmischung auftritt. Das Chromatographiergefäß wird mit diesem Lösungsmittel 24 Stunden gesättigt.

Das Papier (Schleicher & Schüll 2043 b) wird in der durch das Wasserzeichen angegebenen Pfeilrichtung in Streifen von 14,5 cm Breite und 50 cm Länge zerschnitten. Die Startpunkte werden in einem der Apparatur angepassten Abstand vom Rand eingezeichnet. Das vertikal aufgespannte Papier wird nun mit ca. 2 g KW mittels eines Stickstoffgebläses besprüht; darnach wird mit einem Warmluftföhn so viel KW weggeblasen, bis die aufgebrachte Menge KW noch 900 – 1100 mg wiegt (unmittelbar vor dem Einhängen in das Gefäß gewogen). Die Fettsäuren werden in benzolischer Lösung (1%ig; bei Fettsäuren mit mehr als 20 C-Atomen 0,5%ig, um ein Auskristallisieren der Substanz auf der Papieroberfläche zu vermeiden) aufgetragen. Mengen: 50 – 75 γ pro Substanz.

Die Laufzeit beträgt je nach der Aussentemperatur und der Art der Fettsäuren 20 – 45 Stunden: Temperaturerhöhung bewirkt eine etwas höhere Laufgeschwindigkeit. Gemische, die C_{14} - und C_{16} -Carbonsäuren oder höhere und zudem ungesättigte Carbonsäuren enthalten, lässt man bloss 20 Stunden laufen, da die Substanzen sonst den unteren Rand des Papiers erreichen.

Nach Erreichung der vorgesehenen Laufzeit wird das Papier 2 Stunden in einem Trockenschrank von 80 – 100° getrocknet und anschliessend 15 Minuten in ein Bad von Kupferacetat-Lösung (20 ccm gesättigte Lösung pro Liter) getaucht. Dann nimmt man das Papier heraus, lässt es abtropfen und legt es während 15 Minuten in ein 10-Liter-Becken mit Leitungswasser, dem vorher 1 ccm Essigsäure zugesetzt wurde. Während dieser Zeit lässt man stets Wasser zufließen. Um die vollständige Entfernung des Kupferacetat-Überschusses zu gewährleisten, muss das Papier stets von beiden Seiten vom Wasser umspült sein, also nicht etwa zusammengefaltet aneinander liegen. Durch kurzes anschliessendes Eintauchen in ein Bad einer $K_4[Fe(CN)_6]$ -Lösung (200 ccm 7,5%ige wässrige Lösung + 1000 ccm Wasser) bilden sich aus den Kupferseifen der Fettsäuren die braunroten Kupferferrocyanid-Komplexe. Bei richtiger Entwicklung muss das übrige Papier wieder farblos sein. Um den Überschuss an Kaliumferrocyanid zu entfernen, wird das Papier nun noch kurz in Leitungswasser gelegt und dann getrocknet. Durch Lichteinfluss verfärbt sich

das Papier jedoch nach einigen Tagen grünblau. Die braunroten Flecken sind jedoch beständig.

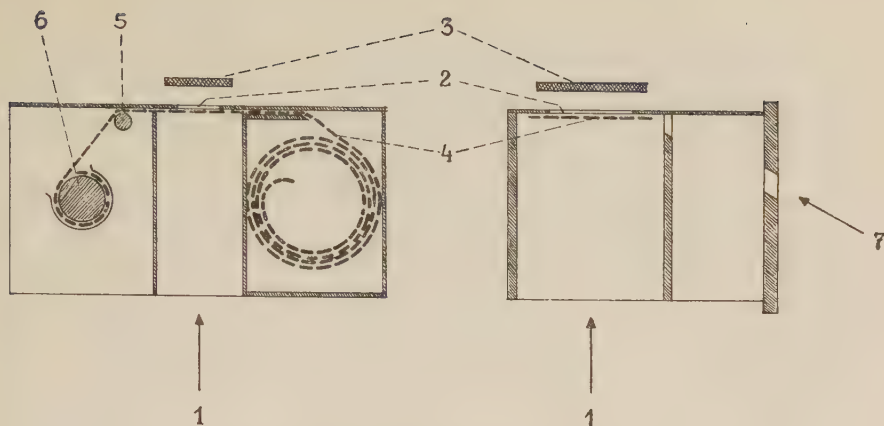
Die Methode ist geeignet zur Trennung von gesättigten Fettsäuren C_{12} - C_{20} , sowie von ungesättigten Fettsäuren C_{16} - C_{22} , je nach dem Grad ihrer Ungesättigtheit.

Ein von Ahrens und Craig⁴⁰ vorgeschlagenes Lösungsmittelgemisch aus Formamid, Acetonitril und Eisessig (1 : 1 : 1 oder 1 : 3 : 3), das im Craig'schen Verteilungsapparat eine sehr gute Trennfähigkeit für höhere Fettsäuren aufweist, wurde auch auf seine Verwendbarkeit in der Papierchromatographie untersucht. Tatsächlich war auch die Trennung auf dem Papier sehr gut und bereits nach 12 Stunden vollkommen, was einen beträchtlichen Zeitgewinn darstellt. Andererseits waren die Flecken des Kupferferrocyanidkomplexes aber ziemlich diffus, und es gelang mit diesem Lösungsmittelgemisch nicht, die höheren Fettsäuren (mit mehr als 20 C-Atomen) weder nach der aufsteigenden noch nach der absteigenden Methode zu trennen.

Quantitative Auswertung der Papierchromatogramme

Nachdem die qualitative Bestimmung von Fettsäuren mit 12–22 C in der beschriebenen Weise einwandfrei gelang, wurde versucht, auf Grund der Flecken des Kupferferrocyanidkomplexes eine quantitative Bestimmung der Fettsäuren aufzubauen. Da die Ränder der Flecken meist unscharf waren, musste darauf verzichtet werden, ihre Grösse als Bestimmungsmass zu verwenden; dagegen schien die Messung ihrer Absorption aussichtsreich. Die fertig entwickelten und getrockneten Papiere wurden demzufolge in 3 cm breite Streifen geschnitten und zwar so, dass die Mittellinie des Streifens möglichst auch durch die Zentren der Flecken ging. An einem Streifenrand trugen wir mit Bleistift eine 5-mm-Skala auf. Mittels eines speziellen Einsatzes in das Lumetron-Kolorimeter*) (an der Stelle des Küvettenhalters), der nach dem Prinzip des Filmtransportes in einer Kleinbildkamera funktioniert und es gestattet, durch eine kleine Öffnung die Skala zu beobachten (vgl. Fig. 1), wurde der Papierstreifen jeweils um 5 mm verschoben und die Absorption unter Verwendung eines Filters von 490 m μ abgelesen.

*) **Lumetron-Kolorimeter** Mod. 401-A der **Photovolt Corp.**, New York

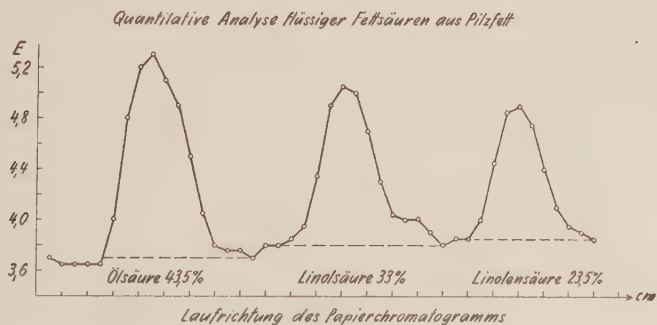


Figur 1

Einsatzgerät für das Lumetron-Kolorimeter
zur Messung der Absorption der auf den Papierstreifen fixierten
Kupferferrocyanidkomplexe

1. Lichtstrahl; 2. Blende 1×2 cm; 3. Photozelle; 4. Chromatogramm-Streifen
(30 mm breit); 5. Führungsspule; 6. Aufwickelspule; 7. Einblick auf die
Skalaeinteilung (5 mm Abstände) des Papierstreifens

Die Absorptionswerte wurden auf Millimeterpapier aufgetragen und die Flächen der Hügel der so entstehenden Kurve bestimmt. Die Gesamttextinktion eines Fleckens ergibt sich durch Addition der Einzelextinktionen nach Abzug des jeweiligen Nullwertes. Erstere ist mit dem Molekulargewicht der zugehörigen Säure zu multiplizieren. Die Summe dieser Werte ist gleich 100 % zu setzen und der prozentuale Anteil der Einzelkomponenten durch einfache Proportionen zu berechnen. Fig. 2 stellt ein Beispiel einer quantitativen Analyse flüssiger Fettsäuren dar.



Figur 2

Anfänglich bestand eine Schwierigkeit darin, dass das Papier nach dem Entwickeln an den Stellen, wo sich keine Säure befand, nicht mehr einheitlich weiss war. Damit nahm bei der Absorptionsmessung der Nullwert unterschiedliche Werte an, und die Ausmessung der Kurvenhügel gelang nicht mehr mit der erforderlichen Genauigkeit. Diese Schwierigkeit konnte durch die Zugabe von 1 ccm Eisessig pro 10 Liter Waschwasser beim Auswaschen der Chromatogramme behoben werden. Eine geringfügige Schwankung des Nullwertes, hervorgerufen durch Strukturunterschiede des Papiers, muss jedoch stets in Kauf genommen werden.

Kritik der Methode

Die Resultate der Bestimmungen bekannter Säuremengen sind jedoch nicht in allen Fällen durchaus befriedigend. Der Grund dafür liegt sowohl in der Messmethode, die infolge ihrer Diskontinuität einen gewissen Fehler mit sich bringt, als auch in der Festlegung des Nullwertes, die subjektiven Schwankungen unterworfen ist. Möglicherweise findet auch nicht immer eine quantitativ gleichmässige Entwicklung der Flecken statt, trotz genauer Einhaltung der Arbeitsvorschrift. Es ist deshalb erforderlich, die Zusammensetzung eines Fettsäuregemisches stets mehrmals zu bestimmen und den Mittelwert zu berechnen.

Zwei Möglichkeiten der Beeinflussung der Resultate durch äussere Einwirkung konnten experimentell ausgeschlossen werden, nämlich die eventuelle unterschiedliche Herauslösung der Fettsäuren aus dem Papier während des Entwicklungsprozesses, sowie eine durchaus denkbare Oxydation der hochungesättigten Fettsäuren während des Auftragens der zu untersuchenden Lösungen auf das Papier. Zwei gleichartige Papierchromatogramme gleicher Mengen eines Gemisches radioaktiver Fettsäuren wurden unentwickelt und entwickelt auf ihre Aktivität untersucht: Durch den Entwicklungsprozess trat nur ein sehr geringfügiger, gleichmässiger Verlust der Aktivität und damit der Fettsäuren ein. Um die Oxydationsmöglichkeit auszuschliessen, wurden Versuche mit Linol- und Linolensäure unter Zugabe einer 0,2%igen Lösung von Octylgallat, dessen antioxydative Wirkung bekannt ist, durchgeführt. Eine Intensitätserhöhung des Linol- oder Linolensäurefleckens konnte indessen nicht beobachtet werden.

Aus den nachfolgenden Beispielen geht hervor, dass es auf diese Weise möglich ist, die prozentuale Zusammensetzung eines Fettsäuregemisches mit einer durchaus befriedigenden Genauigkeit anzugeben :

Vier zeitlich unabhängig voneinander ausgeführte Analysen eines Gemisches von je 100 γ Stearin- und Palmitinsäure ergaben folgende Werte :

% Stearinsäure : 49,5 ; 51,0 ; 51,5 ; 48,0

% Palmitinsäure : 50,5 ; 49,0 ; 49,5 ; 52,0

In einem Gemisch von je 100 γ Laurin-, Myristin-, Palmitin- und Stearinsäure wurden diese Komponenten in folgendem Ausmass wieder aufgefunden (Zahlenangaben in % ; 100 % entspr. 100 γ) :

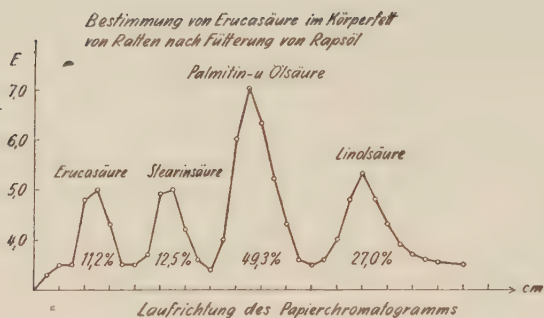
Tabelle 2

Analyse No.	Laurinsäure	Myristinsäure	Palmitinsäure	Stearinsäure
1	94	103	101	101
2	94	96	101	110
3	101	94	115	90
4	103	94	100	103
Mittel	98	97	104	101

Die Untersuchung eines Gemisches aus Eruca-, Stearin-, Palmitin-, Öl- und Linolsäure ergab folgende Resultate (Zahlenangaben in % der Gesamtmenge) (vgl. Fig. 3) :

Tabelle 3

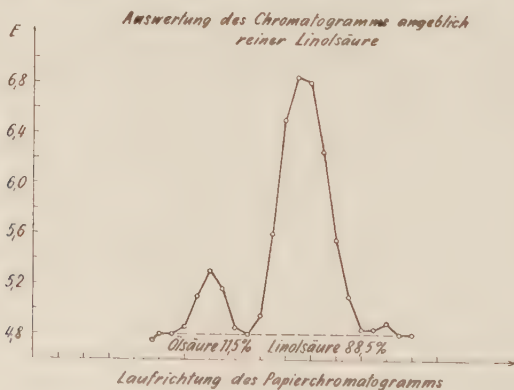
Analyse No.	Erucasäure	Stearinsäure	Palmitin- und Ölsäure	Linolsäure
1	52,5	11,8	27,1	8,5
2	52,0	8,9	28,4	10,6
3	53,0	11,5	24,0	11,5
Mittel	52,5	10,7	26,5	10,2



Figur 3

Natürliche Gemische aus gesättigten und ungesättigten Fettsäuren sind vor der Analyse durch das übliche Bleisalzverfahren in feste und flüssige Säuren zu trennen, da eine Separierung der Palmitin- von der Ölsäure zufolge ihrer gleichen Verteilungskoeffizienten auf dem Papier nicht gelingt.

Gegenüber der bisher üblichen Methode der Destillation der Fettsäure-Ester kommt man mit geringsten Mengen aus und arbeitet unter grösstmöglicher Schonung der Substanzen, was besonders bei Anwesenheit von hochungesättigten Fettsäuren von Bedeutung ist. Unsere Methode erlaubt auch eine Reinheitsprüfung von Fettsäuren. So konnte z. B. festgestellt werden, dass eine als «reinst» in den Handel gebrachte Linsäure ca. 11 % Ölsäure enthielt (Fig. 4).



Figur 4

IV. ZÜCHTUNG DES SCHIMMELPILZES PHYCOMYCES BLAKESLEEANUS IN ¹⁴C-ACETATHALTIGER NÄHRLÖSUNG

Die Züchtung wurde nach den Angaben von *Albrecht* ⁸ durchgeführt.
Die Nährlösung hatte folgende Zusammensetzung :

50 g Glukose Sandoz	}	pro Liter
2 g L-Asparagin		
1 g Hefeextrakt		
0,5 g MgSO ₄ · 7 H ₂ O		
1,5 g KH ₂ PO ₄		
50 γ Aneurin		

Für jeden Versuch wurden in 10 Erlenmeyer-Kolben zu 300 ccm je 50 ccm Nährlösung abgefüllt und während 20 Minuten bei 125° unter Druck sterilisiert. Die Impfung erfolgte mit 3 Tropfen einer wässerigen Sporensuspension einer Reinkultur von *Phycomyces Blakesleeanus*, das Wachstum in einem temperaturkonstanten Raum bei 20° C. Die Pilzkulturen wurden vor direktem Sonnenlicht geschützt und ihr Standort täglich gewechselt, damit keine Bevorzugung einzelner Kolben bezüglich des Lichteinflusses stattfand. Die Verabreichung des radioaktiven Acetats fand zu Beginn oder während des Wachstums an bestimmten Tagen statt. Infektionen konnten praktisch vermieden werden ; sie traten nur bei ganz wenigen Proben auf, die wir eliminierten.

Am 10. Tag nach der Impfung haben wir die Mycele jedes Versuchs vereinigt, gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen und im Vakuumtrockenschrank bei 45° C über CaCl₂ bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Ausbeuten an Trockenmycel waren stets von gleicher

Tabelle 4

Verabreichung von ^{14}C -Acetat zur Nährlösung von je 10 Kulturen von

Tag der Acetatzugabe	Versuch No.	Verabreichte Aktivität Stöße/Min.	Mycel			Nährlösung			Unverseifbares		
			Gewicht g	Spez. Aktivität	% Einbau	Gewicht g	Spez. Aktivität	% Einbau	Gewicht mg	Spez. Aktivität	% Einbau
		$\cdot 10^7$		$\cdot 10^4$			$\cdot 10^2$			$\cdot 10^4$	
1.	4	4,70	3,82	—	—	20,88	—	—	83	3,66	6,46
1.	8	15,00	3,28	1,41	30,8	20,40	5,84	7,94	110	4,88	3,58
2.	13	7,65	3,47	1,17	53,0	20,34	1,75	4,64	98	3,20	4,10
3.	14	7,73	3,53	1,23	56,0	19,43	3,22	8,09	63	5,30	4,32
4.	11	9,30	3,40	1,40	51,1	19,93	1,80	3,86	61	5,30	3,48
4.	16	14,10	3,60	1,88	48,0	21,40	3,14	4,76	49	10,10	3,52
5.	12	9,00	3,42	1,17	44,4	21,25	1,57	3,70	55	2,90	1,79
5.	17	14,10	3,51	0,68	19,4	22,80	1,64	2,67	76	4,32	2,33
6.	15	7,60	3,47	0,89	40,6	21,08	—	—	112	1,96	2,89
7.	6	9,83	3,97	1,07	43,2	17,04	3,59	6,22	238	2,08	5,04
7.	7	17,00	3,35	1,11	21,9	16,85	4,18	4,15	62	4,87	1,78
8.	9	8,00	3,46	0,83	35,9	22,60	1,92	5,41	74	2,78	2,57
9.	10	14,00	3,54	1,03	26,0	20,85	1,85	2,76	90	2,78	1,79

N. B. Die Resultate derjenigen Versuche, bei denen einzelne Kulturen durch Infektion ausfielen, wurden auf einen Ansatz von 10 Erlenmeyer-Kolben umgerechnet.

Tabelle 4

Phycomyces Blakesleeanus an verschied. Tagen der Wachstumsperiode

Totalfettsäuren 1)			Feste Fettsäuren			Flüssige Fettsäuren		
Gewicht mg	Spez. Aktivität	% Einbau	Gewicht mg	Spez. Aktivität	% Einbau	Gewicht mg	Spez. Aktivität	% Einbau
	.10 ⁴			.10 ⁴			.10 ⁴	
261	—	—	79	2,03	3,41	152	7,34	2,37
264	7,00	12,3	86	2,24	1,28	129	6,44	5,54
174	4,79	10,9	58	1,12	0,85	83	4,80	5,21
174	6,50	14,6	35	2,27	1,03	62	6,10	4,90
263	5,18	14,6	83	3,63	3,24	108	6,00	6,96
410	6,56	19,1	126	4,50	4,02	195	7,61	10,50
275	5,00	15,3	78	5,03	4,36	111	4,30	5,31
168 ³⁾	6,26	7,45	30	7,72 ²⁾	1,54	49	4,98 ²⁾	1,73
160	3,67	7,73	63	2,71	2,25	79	2,25	2,34
250	4,75	12,1	59	4,66	2,80	81	4,31	3,55
269	5,25	8,3	96	4,61	2,61	120	5,05	3,56
224	3,00	8,4	52	3,06	1,99	63	2,99	2,35
268	4,10	7,85	80	3,55	2,03	72	3,50	1,80

1) Von den hier angegebenen Mengen der Totalfettsäuren wurden vor der Bleisaltztrennung die Proben für die Verbrennung abgezweigt.

2) Nur eine Bestimmung infolge Substanzmangels

3) Beim Ausschütteln ca. 10 % Verlust

Größenordnung. Das Mycel wurde in einer Hammermühle staubfein zermahlen und — nach Abzweigung einer kleinen Menge für die Aktivitätsbestimmung — mit 60 ccm einer 25%igen methanolischen Kalilauge während 3 Stunden unter Rückfluss und im Stickstoffstrom verseift. Anschliessend wurde die alkalische Lösung zur Gewinnung des Unverseifbaren erschöpfend mit Petroläther ausgezogen und dann unter Kühlung mit 25%iger Schwefelsäure angesäuert und erneut mit Petroläther extrahiert. Die Petroläther-Auszüge haben wir mit Wasser gewaschen, getrocknet u. unter Stickstoff vorsichtig eingedampft. Vom Unverseifbaren und den Totalfettsäuren wurden je zwei Proben zur Aktivitätsbestimmung aufgehoben. Die Gesamtfettsäuren trennten wir über die Bleisalze nach den Angaben von *Hilditch*⁴¹ in «feste» und «flüssige» Säuren. Auch von diesen wurden je zwei Proben aufgehoben; der Rest wurde zur papierchromatographischen Trennung verwendet. Die verbleibende Nährlösung wurde bei leicht alkalischer Reaktion im Vakuum bis zur sirupösen Konsistenz eingedampft. Auch hiervon wurde der ¹⁴C-Gehalt ermittelt, und zwar nach dem in diesem Institut üblichen Verfahren der nassen Verbrennung und Aktivitätsbestimmung des erhaltenen Bariumcarbonats mittels der TRACER-LAB-Apparaturen⁴².

Aus der Tabelle 4 sind die entsprechenden experimentellen Daten, d. h. eingesetzte Aktivität als ¹⁴C-Acetat, Gewichte des Mycels, der Nährlösung, des Unverseifbaren, der Fettsäuren und ihrer spezifischen Aktivitäten ersichtlich, ferner gibt die Tabelle Auskunft über den «Einbau» des ¹⁴C-Atoms in die einzelnen Fraktionen, ausgedrückt in Prozenten der eingesetzten Gesamt-Aktivität. Die Aktivitätsbestimmungen (Verbrennung und Messung der Ba-Carbonat-Aktivität) wurden stets doppelt ausgeführt und die Mittelwerte angegeben.

Die Ausbeuten an Gesamtfettsäuren aus dem erhaltenen Mycel betragen, wie aus der Tabelle 5 hervorgeht, 4,9 — 11,4 %.

Tabelle 5

Tag der Acetatzugabe	Versuch No.	Totalfettsäuren	
		mg	in ‰ der Mycelgewichte
1.	4	261	6,8
1.	8	264	8,0
2.	13	174	5,0
3.	14	174	4,9
4.	11	263	7,7
4.	16	410	11,4
5.	12	275	8,0
5.	17	168	4,8
6.	15	160	4,6
7.	6	250	6,3
7.	7	269	8,0
8.	9	224	6,5
9.	10	268	8,1

V. CHEMISCHE ZUSAMMENSETZUNG DER PILZFETTSÄUREN

Die durch die beschriebenen Pilz-Züchtungen erhaltenen Fettsäuregemische wurden in der Folge einerseits auf Grund der ausgearbeiteten papierchromatographischen Methode analysiert, andererseits papierchromatographisch getrennt und auf ihre Aktivität geprüft.

Aus den folgenden Tabellen (6 und 7) sind die ersteren Resultate ersichtlich. Unter den in Tabelle 6 genannten «höheren Fettsäuren» ist die Gesamtheit der Fettsäuren mit mehr als 18 C-Atomen zu verstehen, die bei der Bleisalttrennung in der Fraktion der «festen Fettsäuren» erscheinen. Sie konnten papierchromatographisch nicht aufgetrennt werden und bestehen, wie *Albrecht* zeigte, aus Behensäure (4,1 %), Lignocerinsäure (5,1 %), $\Delta^{17,18}$ -Tricosencarbonsäure (7 %), Cerotinsäure (3,1 %), Pentacosencarbonsäure (11,9 %). Das durchschnittliche Molekulargewicht betrug 378.

Die angegebenen Fehlergrenzen sind die Mittelwerte der quadratischen Abweichungen der einzelnen Werte gegenüber dem Mittelwert. Die Richtigkeit unseres Befundes hinsichtlich der Zusammensetzung der flüssigen Fettsäuren konnte mit Hilfe des heute häufig gebräuchlichen Isomerisierungsverfahrens überprüft werden. Gleichzeitig bestand die Möglichkeit, die Anwesenheit von Fettsäuren mit mehr als 3 Doppelbindungen auszuschliessen.

Die Isomerisierung von hochungesättigten Fettsäuren ist bekanntlich eine sehr geeignete Methode sowohl zum qualitativen Nachweis von mehrfach ungesättigten Verbindungen als auch zu deren quantitativen Bestimmung.

Tabelle 6

Quantitative Zusammensetzung der festen
Fettsäuren

Tag der Acetatzugabe	Versuch No.	Höhere Fettsäuren	Stearinsäure	Palmitinsäure
		%	%	%
1.	8	50	15	35
1.	8	50	13	37
2.	13	70	9	21
3.	14	70	8	22
4.	16	50	16	34
4.	16	69	6	25
5.	12	55	7	38
5.	12	54	7	39
5.	12	56	7	37
5.	12	50	9	40
5.	12	50	11	39
5.	12	58	9	33
5.	12	55	9	36
6.	15	69	8	23
6.	15	63	12	25
6.	15	60	12	28
6.	15	69	8	22
7.	7	55	12	33
7.	7	62	10	28
8.	9	50	12	38
9.	10	59	12	29
9.	10	55	16	29
Mittel		58,14 $\pm$ 1,52	10,36 $\pm$ 0,61	31,41 $\pm$ 1,37

Tabelle 7

Quantitative Zusammensetzung der flüssigen
Fettsäuren

Tag der Acetatzugabe	Versuch No.	Ölsäure	Linolsäure	Linolensäure
		%	%	%
1.	7	41,5	31,5	27,0
1.	8	40,0	29,0	31,0
1.	8	47,0	22,5	30,5
2.	13	39,0	31,0	30,0
2.	13	41,5	31,0	27,5
3.	14	38,5	25,5	36,0
3.	14	41,0	24,0	35,0
4.	11	50,0	29,0	21,0
5.	12	45,0	30,0	25,0
5.	12	40,5	36,5	23,0
5.	12	40,5	33,0	26,5
5.	12	59,5	21,5	19,0
5.	12	59,0	18,5	22,5
6.	15	45,0	27,5	27,5
6.	15	41,5	28,0	30,0
6.	15	43,0	31,0	25,5
7.	7	37,0	30,5	32,5
8.	9	47,0	30,0	23,0
8.	9	43,0	38,0	18,0
8.	9	42,0	35,0	23,0
8.	9	48,0	30,5	21,5
8.	9	41,5	31,0	28,0
9.	10	43,0	32,0	25,0
9.	10	45,0	30,0	25,0
9.	10	42,0	29,5	28,5
Mittel		44,0 $\pm$ 1,08	29,5 $\pm$ 0,83	26,5 $\pm$ 0,91

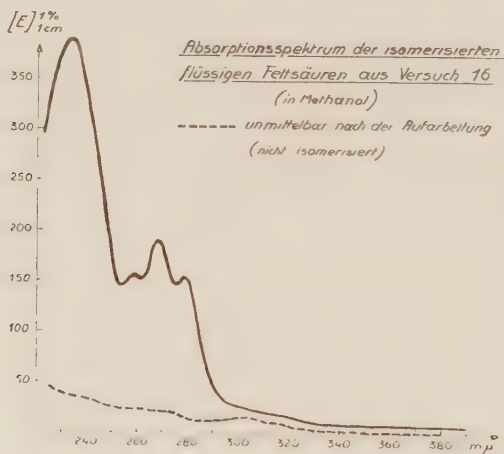
In der Natur vorkommende ungesättigte Fettsäuren weisen fast ausschliesslich keine konjugierten Doppelbindungen auf und zeigen im UV-Bereich von 220 bis 400 m μ keine Absorption. Durch Behandlung mit konzentriertem Alkali werden diese Doppelbindungen in einem gewissen Ausmass zur Konjugation gebracht, und das Spektrum zeigt definierte Maxima. Zur Theorie dieser Umlagerung hat sich kürzlich R. W. Riemenschneider⁴³ geäussert. Das Ausmass der Isomerisierung ist stark abhängig von der Alkali-Konzentration, der Reaktionstemperatur und der Reaktionszeit. R. T. Holman und G. O. Burr⁴⁴ untersuchten die Bedingungen, unter denen die Reaktion möglichst optimal verläuft und teilten entsprechende Arbeitsvorschriften mit, an die wir uns gehalten haben :

Es wird eine 23%ige Lösung von Kaliumhydroxyd pro analysi in reinem, frisch destilliertem Aethylenglykol (Kp. 97 – 98° 16 mm Hg) bereitet und zur Entfernung von vorhandenem Wasser in einem offenen Kjeldahl-Kolben mit freier Flamme auf ca. 180° erhitzt. Nach Abkühlen unter dem Schutz eines Natronkalkrohres wird die Lösung in eine Flasche gefüllt und evtl. über der Lösung befindliche Luft durch Stickstoff verdrängt, um eine Carbonatbildung beim Stehen zu vermeiden. Gut verschlossen, im Dunkeln und in der Kälte aufbewahrt, hält sich die Lösung mindestens einen Monat. 0,5 ccm der KOH-Glykol-Lösung werden in ein Reagensglas aus hitzebeständigem Glas (10 x 1 cm) gebracht, das durch einen locker sitzenden Glasstöpsel verschlossen ist, und 15 Minuten in ein Ölbad von 180° gehängt. Dann wird die zu untersuchende Probe (1 – 2 mg) auf einem Glasscherbchen in die Lösung geworfen, das Rohr kräftig geschüttelt und genau 8 Minuten weiter erwärmt. Das Glas bringt man hierauf nach raschem Abwischen zur Abstopfung der Reaktion unter fließendes Wasser. Das Reaktionsgemisch wird dann mit reinstem, aldehydfreiem Methanol quantitativ in ein Messkölbchen gespült, auf geeignete Weise mit Methanol verdünnt und über Nacht im Kühlschrank stehen gelassen. Am nächsten Morgen wird das Spektrum aufgenommen.

Im Prinzip weist jede Konjugationsstufe drei Maxima auf ; oft können aber nicht immer alle erkannt werden, da sie teilweise ausserhalb des Messbereiches liegen oder mit dem Maximum der nächstniedrigeren Konjugationsstufe zusammenfallen. Ferner erhält man

z.B. bei der Konjugation von Arachidonsäure (Tetraen) neben der Konjugation von vier Doppelbindungen auch solche von drei und zwei Doppelbindungen, was in der Extinktionskurve zum Ausdruck kommt. Ebenso ergibt Linolensäure nicht nur konjugiertes Trien, sondern auch konjugiertes Dien.

Die quantitative Auswertung der Extinktionskurve geschieht unter Zuhilfenahme von Eichwerten der entsprechenden reinen Substanz. Im vorliegenden Fall (flüssige Fettsäuren aus Versuch 16) (vgl. Fig. 5) enthält das Substanzgemisch Dien (Linolsäure, Maximum bei 233 m μ) und Trien (Linolensäure, λ_{max} . 268 m μ) neben der ebenfalls vorhandenen Ölsäure, die aber im Spektrum nicht erkennbar ist. Eine Tetraen- oder noch höher ungesättigte Verbindung ist jedoch nicht vorhanden, da keine weiteren Maxima auftreten (λ_{max} . für Tetraen 315 m μ , λ_{max} . für Pentaen 346 m μ , λ_{max} . für Hexaen 373 m μ).



Figur 5

Nach R. W. Riemenschneider⁴³ berechnet man die quantitative Zusammensetzung eines Gemisches von Öl-, Linol- und Linolensäure wie folgt:

$$y = \frac{100 \cdot k'_{268}}{K^{3}_{268}} \quad \% \text{ Linolensäure}$$

$$z = \frac{100 \cdot k'_{233} - y \cdot K^{3}_{233}}{K^{2}_{233}} \quad \% \text{ Linolsäure}$$

wobei

$$\left. \begin{array}{l} k'_{268} \\ k'_{233} \end{array} \right\} = \text{spezifische Extinktionswerte der isomerisier-} \\ \text{ten Probe bei den angegebenen Wellenlängen}$$

$$\left. \begin{array}{l} K^{3_{233}} \\ K^{3_{268}} \end{array} \right\} = \text{spezifische Extinktionswerte von reiner Lino-} \\ \text{lensäure bei den angegebenen Wellenlängen}$$

$$K^{2_{233}} = \text{spezifische Extinktion von reiner Linolsäure} \\ \text{bei } 233 \text{ m}\mu.$$

Der Prozentgehalt an Ölsäure ergibt sich durch Differenzbildung gegen 100. Wir fanden für k'_{268} 190 und für k'_{233} 388. Für reine Linol- und Linolensäure betragen diese Werte für $K^{3_{233}}$ 710, für $K^{3_{268}}$ 810 und für $K^{2_{233}}$ 824. Es ergibt sich demnach für die flüssigen Fettsäuren folgende Zusammensetzung :

$$y = \frac{100 \cdot 190}{810} = 23,5 \% \text{ Linolensäure}$$

$$z = \frac{100 \cdot 388 - 23,5 \cdot 710}{824} = 26,8 \% \text{ Linolsäure}$$

und demzufolge

49,7 % Ölsäure

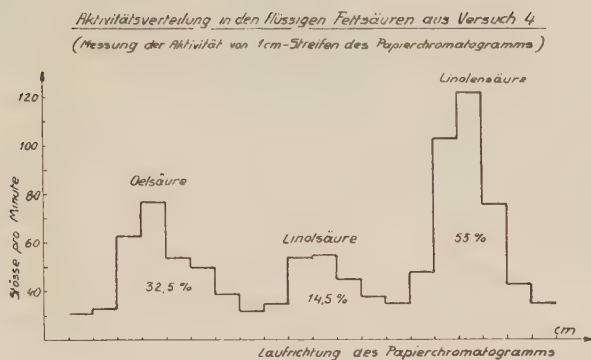
In diesem Zusammenhang wurde die Frage geprüft, ob die Verseifung des Pilzmycels (3 Stunden Rückfluss mit 25%igem methanolischem KOH) nicht bereits eine Isomerisierung der ungesättigten Fettsäuren mit sich bringe. Es wurde daher unmittelbar nach der Bleisalztrennung ein Spektrum der flüssigen, in absolutem, aldehydfreiem Methanol gelösten Fettsäuren aus Versuch 16 aufgenommen. Die Kurve der spezifischen Extinktion (vgl. Fig. 5) zeigt keine Maxima und fällt über 330 m μ gegen Null ab. Auf Grund dieses Befundes kann eine Isomerisierung durch die stark alkalische Verseifung praktisch ausgeschlossen werden oder höchstens in einem sehr geringen Ausmasse vorliegen.

VI. AUSWERTUNG DER PAPIERCHROMATOGRAMMEHINSICHTLICH DER RADIOAKTIVITÄT EINZELNER FETTSÄUREFLECKEN

Von jedem Gemisch wurden stets zwei Proben auf einem Papierstreifen gleichzeitig chromatographiert und das eine Chromatogramm nach der beschriebenen Methode zur Lokalisierung der Säuren entwickelt. Von der zweiten Hälfte des Papiers mit dem anderen Chromatogramm wurde nun ein 2 cm breiter Streifen derart ausgeschnitten, dass seine Mittellinie senkrecht zur Startlinie stand und durch den Startpunkt lief. Der Bereich der Fettsäureflecken wurde in 1 cm lange Papierstücke aufgeteilt. Dieselben klebten wir auf Kupferplättchen und bestimmten im Tracerlab Superscaler die Aktivität, indem zumeist dreimal 600 Stösse gezählt wurden. Die so erhaltenen Resultate trugen wir auf Millimeterpapier auf (vgl. Fig. 6). Die den Nullwert (30 – 31 Stösse/Min.) übersteigenden Stosszahlen wurden für jede Säure gesondert addiert und aus diesen Werten das prozentuale Verhältnis berechnet (vgl. Tabelle 8). Im Gegensatz zur beschriebenen quantitativen Auswertung der Papierchromatogramme liegt hier ein kontinuierliches Verfahren vor. Die erhaltenen Stosszahlen sind ein direktes Mass für die Aktivität der betreffenden Substanzen. Die Streuung der Messresultate lässt sich – abgesehen vom statistischen Fehler der Zählmethode selbst – dadurch erklären, dass bei der Chromatographie die Säuren nicht immer genau senkrecht zur Startlinie laufen und der 2 cm breite Streifen kleine Randzonen der aktiven Gebiete nicht mehr enthält. In den meisten Fällen waren die entwickelten Flecke jedoch nicht breiter als 1,5 cm.

Durch Zugabe von ^{14}C -Acetat zur Nährlösung wachsender Schimmelpilze werden aus dem Mycel radioaktive Fettsäuren erhalten. Unsere Methode erlaubt uns, die Verteilung dieser Aktivität auf die

Figur 6



einzelnen Komponenten der festen und flüssigen Fraktionen durch papierchromatographische Trennung der Fettsäuren quantitativ zu messen. Wird Acetat am 1. Tag zugefügt, so weist die *Linolensäure* eine etwa doppelt so hohe Aktivität auf als die *Ölsäure*, obwohl sie nur etwa 25 % des Gemisches ausmacht, diese aber zu 50 % daran partizipiert. Nach Acetatzugabe am 2. Tag ist die *Linolensäure*-Aktivität bereits geringer und zeigt in der Folge bei Zugabe am 2. bis zum 9. Tag eine lineare Abnahme auf etwa ein Drittel. Die *Ölsäure* weist unabhängig von der Acetatzugabe eine ziemlich gleichbleibende Aktivität von 30 – 40 % auf. Diejenige der *Linolsäure* beträgt bei Acetatzugaben am 1., 2., 3. und 4. Tag stets nur etwa 15 %. Darnach erfolgt ein rascher Anstieg bis zu den für die *Ölsäure* beobachteten Werten.

Auch für die festen oder gesättigten Säuren ergeben sich ausgesprochene Unterschiede. Höchste Aktivitäten (60 %) finden wir nach Acetatzugabe am 1. Tag für die *Palmitinsäure*, dann aber ein Absinken auf etwa 25 %, wenn die Zugabe am 5. Tag erfolgt. Die Aktivität steigt aber wieder an; wird Acetat am 9. Tag zugefügt, so beträgt sie bereits über 50 %. Die *Stearinsäure* verhält sich bis zum 5. Tag gleich der *Linolsäure*, dann sinkt ihre Aktivität unter 10 %, steigt indessen langsam wieder an, so dass bei Zugabe am 9. Tag wiederum etwa 15 % gemessen werden können. Ein interessantes Verhalten wurde auch für die höheren Fettsäuren festgestellt, welche sich wie

Tabelle 8

Prozentuale Aktivitätsverteilung bei den
Papierchromatogrammen

a) Flüssige Fettsäuren

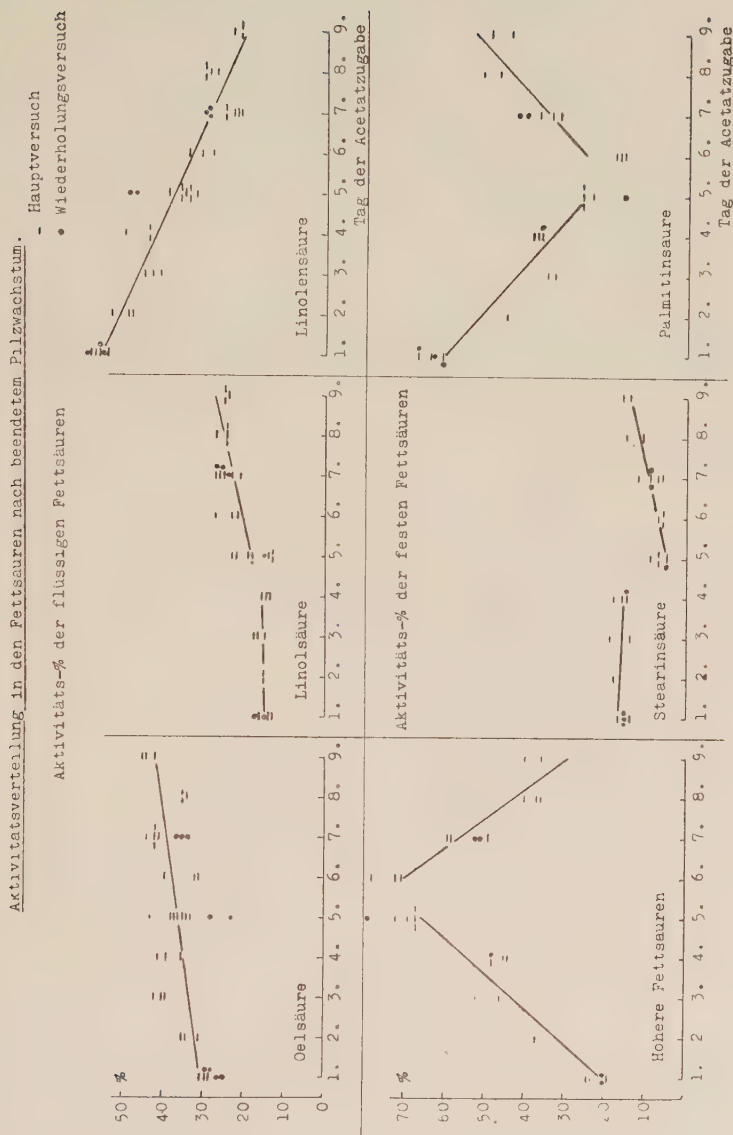
Tag der Acetatzugabe nach Beginn des Pilzwachstums	Versuch No.	Ölsäure %	Linolsäure %	Linolensäure %
1.	4	29,5	13,5	57
		30,5	16	53,5
		28	14,5	57,5
		28,5	15,5	56
1.	8	27,5	15	57,5
		26,5	14	54,5
		28	16,5	55,5
		25,5	15,5	59
2.	13	34	16	50
		31	15,5	53,5
		35	16	49
3.	14	39,5	17,5	43
		39,5	15	45,5
		42	17	41
4.	11	40	15,5	44,5
		41	14,5	44,5
		35,5	14	50,5
5.	12	43,5	23	33,5
		33	32	35

Tag der Acetatzugabe nach Beginn des Pilzwachstums	Versuch No.	Ölsäure %	Linolsäure %	Linolensäure %
5.	12	37,5	28,5	34
		37	23	39,5
		33	24,5	35,5
		34	34	32
		36	28	36
5.	17	23	28	49
6.	15	39,5	32	28,5
		32	33,5	34,5
		31,5	37,5	31
7.	6	42	35	23
		44	31	25
		42	33	25
		42	36	22
		41	37	22
7.	7	36	34,5	30
		34	36,5	29
		34,5	36	29,5
8.	9	36	37	27
		34,5	35	30,5
		35,5	34,5	30
		35	34,5	30,5
9.	10	44	35	21
		45	34	21
		42	35	23

b) Feste Fettsäuren

Tag der Acetatzugabe nach Beginn des Pilzwachstums	Versuch No.	Höhere Fettsäuren %	Stearinsäure %	Palmitinsäure %
1.	4	18,5 23,5 24,5	14,5 15 17,5	67 61,5 58
1.	8	16 20,5 20,5	16,5 16,5 17,5	67,5 63 62
2.	13	37	18	45
3.	14	46 52	19 14,5	35 33,5
4.	11	48 43,5 45	15 18 16,5	37 38,5 38,5
4.	16	48	14,5	37,5
5.	12	67 69 67 67 72	7 5 9 7 5	26 26 24 26 23
5.	17	80	5,5	14,5
6.	15	72 70,5 78,5	5,5 6 7,5	22,5 23,5 14
7.	6	49 59 58 59	13 7,5 9 7,5	38 33,5 33 33,5
7.	7	52 51 49	9 9 9	39 40 42
8.	9	37,5 37	11,5 15	51 48
9.	10	40 37	16 14	44 49

Figur 7



erwähnt aus einem Gemisch von Behen-, Lignocerin-, Cerotinsäure, $\Delta^{17,18}$ -Tricosencarbonsäure und Pentacosencarbonsäure zusammensetzen und chromatographisch nicht aufgetrennt wurden. Acetatzugabe am 1. Tag führt hier nur zu geringer Aktivität von ca. 15 %. Sehr rasch nimmt sie aber zu und erreicht bei Zugabe am 5. Tag einen Höchstwert von 70 %. Dann ist ein rascher Abfall feststellbar ; wenn Acetat am 9. Tag zugesetzt wird, weisen diese Säuren noch 30 % der Gesamt-Aktivität auf.

Statistische Auswertungen

Wir haben diese prozentualen Aktivitäts-Verteilungen in ein Koordinatensystem eingetragen und für die erhaltene Punkteschar die Regressionsgerade sowie deren Bestimmtheitsmass B ausgerechnet⁴⁵.

Für die Aktivitätsverteilungen der *Linolensäure* ergab sich folgende Geradengleichung :

$$y = -4,47 x + 59,61$$

und ein Bestimmtheitsmass von $B = 0,91$.

Bei den höheren Fettsäuren musste die Gerade in einen aufsteigenden (1.—5. Tag) und einen absteigenden Ast (6.—9. Tag) unterteilt werden. Die Berechnungen ergaben hier :

a) für den aufsteigenden Ast

$$y = 11,23 x + 9,60 \quad B = 0,93$$

b) für den absteigenden Ast

$$y = -13,18 x + 148,44 \quad B = 0,88$$

Auch bei der *Palmitinsäure* war diese Unterteilung erforderlich :

a) absteigender Ast

$$y = -9,44 x + 71,66 \quad B = 0,93$$

b) aufsteigender Ast

$$y = 9,17 x - 29,64 \quad B = 0,69$$

Regressionsgeraden und Bestimmtheitsmasse wurden auch für die übrigen Säuren berechnet :

Stearinsäure

$$1.-4. \text{ Tag : } y = -0,089 x + 16,59 \quad B = 0,0058$$

$$5.-9. \text{ Tag : } y = 2,14 x - 5,11 \quad B = 0,71$$

Ölsäure

$$1.-9. \text{ Tag: } y = 1,26 x + 29,41 \quad B = 0,35$$

Linolsäure

$$1.-4. \text{ Tag: } y = 0,0572 x + 15,26 \quad B = 0,004$$

$$5.-9. \text{ Tag: } y = 2,55 x + 15,66 \quad B = 0,69$$

Die hohen B-Werte von 0,93, 0,88, 0,93 zeigen an, dass die berechneten Geraden der wirklichen Verteilung der Punkte sehr gut entsprechen. Die Werte 0,71, 0,69, 0,69 lassen erkennen, dass auch in diesem Fall rund 70 % der Punkte einer Geraden zugehören. Bei den ganz kleinen B-Werten (0,0058, 0,004) besteht praktisch keine Abhängigkeit der y- von den x-Werten; diese Geraden verlaufen fast horizontal.

Berechnung der prozentualen und spezifischen Aktivitäten der einzelnen Komponenten des Fettsäuregemisches

Die prozentuale Aufteilung der Gesamtfettsäuren in flüssige und feste lässt sich auf Grund der Angaben der Tabelle 9 wie folgt berechnen :

Tabelle 9

Tag	Versuch No.	Feste Fettsäuren %	Flüssige Fettsäuren %
1.	4	34,2	65,8
1.	8	40,0	60,0
2.	13	41,1	58,9
3.	14	36,1	63,9
4.	11	43,3	56,6
4.	16	39,3	60,7
5.	12	41,2	58,8
5.	17	38,0	62,0
6.	15	44,4	55,6
7.	6	42,1	57,9
7.	7	44,4	55,6
8.	9	45,2	54,8
9.	10	—	— *
Mittel		40,78	59,22

*) Werte ungenau

Erfahrungsgemäss führt die Bleisalztrennung zu Verlusten. Ausgehend von der Voraussetzung, dass sich dieselben gleichmässig auf beide Fraktionen verteilen, wurde auf der Basis der erhaltenen Mittelwerte die tatsächliche Menge an festen und flüssigen Säuren berechnet. Diese Werte haben wir nun mit den spezifischen Aktivitäten multipliziert, die sich aus den Aktivitätsbestimmungen durch die Verbrennungsanalyse ergeben (vergleiche Tabelle 4) und so die totale Stosszahl für die flüssigen und festen, sowie durch Addition derselben diejenige der Totalfettsäuren erhalten. Letzterer Wert ist infolge der bei der Bleisalztrennung auftretenden Verluste kleiner als derjenige, den man durch Multiplikation des Gewichts der isolierten Totalfettsäuren mit ihrer spezifischen Aktivität erhält. Es hat jedoch keinen Sinn, diesen Wert zu berücksichtigen, da bei der papierchromatographischen Trennung die verloren gegangenen Anteile auch nicht mehr in Erscheinung traten.

Die totalen Stosszahlen der flüssigen bzw. festen Fettsäuren wurden gemäss der prozentualen Aktivität (Mittel der Werte aus Tabelle 8) auf die einzelnen Fettsäuren aufgeteilt. Diese Werte ergaben den prozentualen Anteil der Aktivität der einzelnen Fettsäuren bezogen auf diejenige der Gesamtfettsäuren (vgl. Tabelle 10 und Figur 8).

Auf Grund der quantitativen Zusammensetzung der flüssigen und festen Säuren (Tabelle 6 und 7) konnten auch die gewichtsmässigen Anteile der einzelnen Fettsäuren bei den verschiedenen Versuchen ermittelt werden. Durch Division der Stosszahlen durch diese Werte wurde die spezifische Aktivität berechnet (vgl. Tabelle 10 und Figur 9).

Tabelle 10

Prozentuale und spezifische Aktivitäten der einzelnen Fettsäuren

Tag der Acetatzugabe	Versuch No.	Höhere Fettsäuren		Stearinsäure		Palmitinsäure		Ölsäure		Linolsäure		Linolensäure	
		% d. Aktiv. d. Totalfetts.	spez. Aktivität $\cdot 10^4$	% d. Aktiv. d. Totalfetts.	spez. Aktivität $\cdot 10^4$	% d. Aktiv. d. Totalfetts.	spez. Aktivität $\cdot 10^4$	% d. Aktiv. d. Totalfetts.	spez. Aktivität $\cdot 10^4$	% d. Aktiv. d. Totalfetts.	spez. Aktivität $\cdot 10^4$	% d. Aktiv. d. Totalfetts.	spez. Aktivität $\cdot 10^4$
1.	4	3,5	0,77	2,5	3,1	9,9	4,0	24,5	4,9	12,4	3,7	47,2	15,6
1.	8	3,7	0,73	3,3	3,7	12,5	4,6	21,6	3,9	12,3	3,3	45,5	13,7
2.	13	5,2	0,72	2,5	2,0	6,3	1,6	28,6	3,6	13,6	2,6	43,8	9,3
3.	14	10,0	1,9	3,4	3,7	7,0	2,5	32,2	5,6	13,1	3,4	34,3	10,0
4.	11	13,3	2,8	4,8	5,8	11,1	4,4	27,5	5,3	10,6	3,0	32,9	10,5
4.	16	13,9	3,7	4,2	6,4	10,8	5,4	—	—	—	—	—	—
5.	12	30,3	5,9	2,9	3,2	11,1	4,0	20,1	3,5	15,2	3,0	19,4	5,7
5.	17	41,8	10,6	2,9	4,1	7,6	3,6	—	—	—	—	—	—
6.	15	33,2	3,4	2,9	1,7	9,1	1,7	18,8	1,8	18,8	2,6	17,2	2,7
7.	6	24,0	4,5	4,0	4,2	14,7	5,1	24,2	4,1	19,7	5,0	13,1	3,8
7.	7	19,6	4,0	3,5	4,0	15,6	5,9	21,2	4,0	21,8	6,1	18,1	5,7
8.	9	15,3	2,0	5,5	4,4	21,1	5,0	20,8	2,4	20,8	3,6	17,4	3,4
9.	10	15,8	2,4	6,1	5,1	19,1	5,3	25,8	3,5	20,5	4,1	12,8	2,9

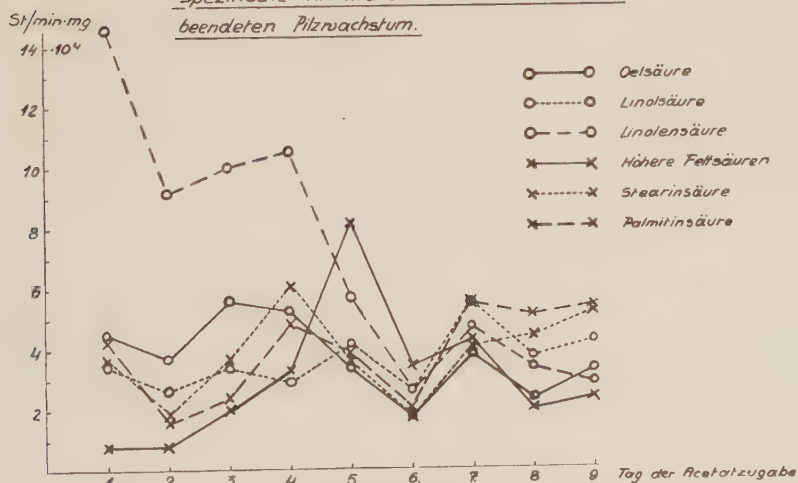
Figur 8

Aktivitätsverteilung in den Fettsäuren nach beendetem Pilzwachstum
(bezogen auf die Totalfettsäuren)



Figur 9

Spezifische Aktivitäten der Fettsäuren nach beendeten Pilzwachstum.



VII. SIGNIERUNGSVERSUCH MIT ^{14}C -FORMIAT

In den letzten Jahren wurde verschiedentlich auf in vivo verlaufende Reaktionen hingewiesen, bei denen ein Einbau des Formiat-C-Atoms in biologische Substrate erfolgt. Nachdem die Synthese besonders der stärker ungesättigten Fettsäuren keineswegs geklärt ist, schien es nicht abwegig, durch Formiat-Zugabe zur Nährlösung unseres Pilzes die Verwendung dieses C_1 -Bruchstückes am Fettsäureaufbau zu eruieren oder auszuschliessen. Wir haben daher der Nährlösung zu Beginn des Pilzwachstums radioaktives Formiat mit einer Gesamtstosszahl von $3,15 \cdot 10^8$ St./Min. verabreicht. Nach Beendigung des normal verlaufenen Wachstums ergab sich ein Trockenmycel von 3,74 g. Hievon wurden 3,00 g verseift und wie angegeben aufgearbeitet. Die Resultate dieses Versuches sind nachstehend aufgeführt:

	Gewicht	Spez. Aktivität St./Min. mg
Mycel	3,74 g	$4,19 \cdot 10^4$
Nährlösung	17,4 g	$4,07 \cdot 10^3$
Unverseifbares	59 mg	$5,38 \cdot 10^4$
Totalfettsäuren	165 mg	$4,00 \cdot 10^3$
Feste Fettsäuren	45 mg	$4,46 \cdot 10^3$
Flüssige Fettsäuren	64 mg	$3,50 \cdot 10^3$

Zum Vergleich sei an die entsprechenden Acetat-Versuche erinnert (siehe Tabelle 4), wo folgende spezifischen Aktivitäten festgestellt wurden: Nährlösung $5,84 \cdot 10^2$, Mycel $1,41 \cdot 10^4$, Unverseifbares $4,88 \cdot 10^4$, Totalfettsäuren $7,00 \cdot 10^4$, feste Fettsäuren $2,24 \cdot 10^4$, flüssige Fettsäuren $6,41 \cdot 10^4$.

Der Einbau von Formiat in das Pilzmycel erfolgte also in einem rund viermal stärkeren Ausmass. Ebenso ist in der Nährlösung eine Aktivi-

tät zu finden, die rund 8 – 10 Mal höher ist. Im Unverseifbaren ist die Aktivität nur unwesentlich höher, hingegen wiesen die Totalfettsäuren, ferner die festen und flüssigen Fettsäuren eine spezifische Aktivität auf, die unter einem Zehntel derjenigen der Acetat-Versuche liegt.

VIII. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Um Einblicke in den Entstehungsmechanismus der Fettsäuren zu gewinnen, kultivierten wir einen Schimmelpilz (*Phycomyces Blakesleeanus*), dessen Fähigkeiten zur Fettsäurebildung bekannt war und fügten zur Nährlösung an bestimmten Tagen vom Beginn des Wachstums an gerechnet kleine Mengen radioaktiven Acetates. Unter Heranziehung der Isotopentechnik wurde demnach eine Signierung der sich bildenden Fettsäuren angestrebt in der Hoffnung, auf Grund sich ergebender Unterschiede in der Aktivität der einzelnen Säuren zu Aussagen über ihre Entstehung zu gelangen. Da eine grosse Versuchsreihe notwendig war, die Anzahl der Einzelkulturen aber nicht beliebig ausgedehnt werden konnte, kam die Gewinnung von Fettmengen, wie sie zur Trennung der Fettsäuren durch Destillation ihrer Methylester notwendig wären, nicht in Frage. Nachdem brauchbare chromatographische Methoden nicht vorlagen, wurde ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung kleiner Mengen gesättigter und ungesättigter Fettsäuren mit 12 – 22 C-Atomen durch Papierchromatographie ausgearbeitet und durch zahlreiche Analysen bekannter Fettsäuregemische kontrolliert. Es beruht auf der Verwendung von petrolgetränktem Papier und der Entwicklung der Fettsäureflecken mit Kupferacetat bzw. Kaliumferrocyanid. Die braunen Kupferferrocyanidkomplexe werden mittels eines Photometers auf Grund ihrer Lichtabsorption ausgewertet.

Wir haben die Pilzzüchtung stets am 10. Tag nach Impfung abgebrochen und unter solchen Bedingungen im Mittel 6,9 % Lipide aus dem Mycel erhalten. Sie wiesen folgende Zusammensetzung auf :

Palmitinsäure	12,8 %
Stearinsäure	4,2 %

Ölsäure	26,1 %
Linolsäure	17,5 %
Linolensäure	15,7 %
Höhere Fettsäuren C ₂₂ – C ₂₆	23,7 %

Albrecht⁸ liess die Pilze 14 Tage wachsen. Nach diesem Zeitpunkt war der Lipidgehalt mit etwa 20 % bedeutend höher und die Zusammensetzung des Fettsäuregemisches etwas verschieden. Er fand z. B. 23,7 % Palmitinsäure, 12,9 % höhere Fettsäuren und nur noch 3,4 % Linolensäure.

Nach Zugabe von ¹⁴C-Acetat zur Nährlösung erwiesen sich Unverseifbares und Fettsäuren als radioaktiv in Analogie zu den früheren Befunden unter Verwendung von Deuterium zur Signierung der sich im Pilze bildenden Lipide. Wird das Acetat am 1. Tag zugefügt, so weist die am 10. Tage aus den Pilzen isolierte Linolensäure eine Aktivität auf, die diejenige aller andern Säuren weit überragt. Linolensäure wird offenbar zu Beginn der Pilzentwicklung ausgesprochen bevorzugt gebildet; vielleicht kommt ihr im Sinne eines Wachstoffs eine besondere Bedeutung für das Pilzwachstum zu. Es ist zu bedenken, dass diese Synthese während des 10 Tage dauernden Versuches weitergeht und die gemessene Aktivität ursprünglich noch bedeutend höher war. Die für Tier und Mensch essentielle Linolsäure zeigt während der ersten 4 Tage nur eine geringe, später ansteigende Aktivität. Sie dürfte daher nicht dieselbe Rolle spielen wie die dreifach ungesättigte Linolensäure. Die Säuren mit 22 – 26 C-Atomen weisen nach Acetatzugabe am 1. Tag nur eine geringe spezifische Aktivität auf, die indessen rasch zunimmt und am 5. Tag ein Maximum erreicht. Ihre Synthese erfolgt in diesem Zeitpunkt intensiver als zu Beginn, und die Vermutung scheint berechtigt, die Linolensäure, deren Aktivität allmählich abfällt, werde in diese höher molekularen Säuren umgewandelt. Mead und Mitarbeiter⁴⁶ zeigten, dass im Organismus der Ratte aus Linolensäure Arachidonsäure gebildet wird, und ganz kürzlich hat Klenk⁴⁷ weitere solche Kettenverlängerungen bewiesen.

Die Ölsäure wird offenbar während der Gesamtdauer des Pilzwachstums stets gleichmässig aufgebaut und ist sicher kein «precursor» für die höher ungesättigten Säuren mit 18 C-Atomen, wie das Sim-

mons und Quackenbusch⁷ im Falle der Fettbildung bei der Sojabohne zeigten. Ob sie jedoch aus Linolensäure durch fortschreitende Hydrierung entsteht im Sinne der Vorstellungen von Hilditch⁶ erlauben unsere Versuche nicht zu entscheiden.

Die gesättigten Säuren sind gegenüber den ungesättigten in der Minderheit. Bei der Palmitinsäure fanden wir die höchste Aktivität. Auf die Gesamtfettsäuren verteilt tritt dieselbe aber zurück und lässt sich keineswegs mit derjenigen der Linolen- oder Ölsäure vergleichen. Die spezifische Aktivität der Stearinsäure ist ähnlich; wahrscheinlich ergeben sich in einem späteren Stadium, z. B. bei der Sporenbildung andere Verhältnisse, die noch geprüft werden sollen.

Unsere Versuche haben jedenfalls mit aller Deutlichkeit gezeigt, dass die Linolensäure gleich zu Beginn des Pilzwachstums vorherrschend in Erscheinung tritt und bevorzugt gebildet wird. Ferner darf als gesichert gelten, dass die Säuren mit mehr als 18 C-Atomen erst allmählich entstehen und am 5. Tag einen maximalen Acetateinbau aufweisen. In den meisten Fällen waren sehr prägnante Aktivitätsänderungen zwischen dem 5. und 6. Tag des Wachstums feststellbar. Sie fallen mit der Sporenbildung zusammen, also mit dem Übergang der vegetativen in die reproduktive Phase.

Die gewählte Versuchsanordnung, die Zugabe von radioaktivem Acetat zur Nährlösung des Schimmelpilzes hat unseres Erachtens zu aufschlussreichen Ergebnissen hinsichtlich der Synthese der Fettsäuren durch diesen Mikroorganismus geführt.

IX. ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wurde auf die experimentell wenig fundierten Vorstellungen über die Entstehung der ungesättigten Fettsäuren hingewiesen und der Versuch unternommen, durch Zugabe von radioaktivem Acetat zur Nährlösung eines fettbildenden Schimmelpilzes eine Signierung der entstehenden Fettsäuren zu erreichen, die Hinweise bezüglich ihrer zeitlichen oder bevorzugten Bildung geben könnte.
2. Dazu war ein Verfahren zur exakten Trennung kleiner Fettsäuremengen notwendig, das in der Folge, ausgehend von der Verwendung petrolgetränkter Papiere und Kupferacetat bzw. Kaliumferrocyanid zur Entwicklung, gefunden wurde. Auf papierchromatographischem Wege gelingt damit eine befriedigende quantitative Analyse von Fettsäuregemischen, enthaltend gesättigte und ungesättigte Fettsäuren mit 12 bis 22 C-Atomen.
3. In zahlreichen Versuchen wurde zur vornehmlich aus Glukose bestehenden Nährlösung eine einmalige Dosis von ^{14}C -Acetat gefügt und zwar in entsprechenden Versuchsreihen am ersten bis neunten Tag nach Impfung mit den Sporen von *Phycomyces Blakesleeanus*. Nach dem zehnten Tag isolierten wir aus dem Mycel die Fettsäuren.
4. Wir ermittelten die genaue Zusammensetzung des Fettsäuregemisches nach Trennung in feste und flüssige Anteile mittels der erwähnten papierchromatographischen Methode und bestimmten die Aktivität der einzelnen Fettsäureflecken auf dem Papierchromatogramm. Daraus konnten die spezifischen Aktivitäten und die Aktivitätsverteilung berechnet werden.
5. Nach unmittelbarer Acetatzugabe beim Wachstumbeginn weist

die Linolensäure die höchste spezifische Aktivität auf. Sie wird zu diesem Zeitpunkt bevorzugt gebildet und dürfte offenbar für das Pilzwachstum von besonderer Bedeutung sein.

6. Die Säuren mit 22, 24 und 26 C-Atomen weisen anfänglich eine geringe, dann stark ansteigende Aktivität auf. Ihre Bildung aus der Linolensäure ist auf Grund dieses Befundes nicht ausgeschlossen.
7. Die Ölsäure zeigt stets gleichbleibende Aktivität. Die Linolsäure verhält sich ähnlich.
8. Von den gesättigten Säuren ist die Palmitinsäure anfänglich am stärksten aktiv.
9. In der Zeit zwischen dem fünften und sechsten Tag der Wachstumsperiode, während des Überganges des Pilzes von der vegetativen zur reproduktiven Phase, zeigen die Aktivitäten aller geprüften Säuren charakteristische Veränderungen.
10. ^{14}C -Formiat wird aus der Nährlösung nur zu einem geringen Mass in den Lipidanteil des Pilzes eingebaut.
11. Durch Zugabe radioaktiven Acetats zur Nährlösung im beschriebenen Sinne ergeben sich somit Einblicke in den Verlauf der Fettsäuresynthese bei diesem Mikroorganismus.

X. LITERATURVERZEICHNIS

1. Karl Bernhard, Z. physiol. Chem. 267, 91 (1940), 267, 99 (1940).
2. K. Bloch und D. Rittenberg, J. biol. Chem. 145, 625 (1942).
3. D. Rittenberg und K. Bloch, J. biol. Chem. 159, 45 (1945), 160, 417 (1945).
4. F. Lipmann, Harvey Lectures Ser. 44, 99 (1948 — 1949).
5. F. Lynen, E. Reichert und L. Rueff, Ann. 574, 1 (1951).
6. T. P. Hilditch, Nature 167, 298 (1951), Ann. Rev. Biochem. 22, 128 (1953), Oléagineux 10, 83 (1955).
7. R. O. Simmons und F. W. Quackenbusch, J. Am. Oil Chem. Soc. 31, 441 (1954).
8. Karl Bernhard und H. Albrecht, Helv. Chim. Acta 31, 977 (1948).
9. Karl Bernhard und H. Albrecht, Helv. Chim. Acta 31, 2214 (1948).
10. H. P. Kaufmann, Fette und Seifen 52, 331 (1950).
11. H. P. Kaufmann, J. Budwig und E. Duddek, Fette und Seifen 53, 285 (1951).
12. H. P. Kaufmann und J. Budwig, Fette und Seifen 53, 390 (1951).
13. H. P. Kaufmann, J. Budwig und C. W. Schmidt, Fette und Seifen 53, 406 (1951).
14. H. P. Kaufmann, J. Budwig und C. W. Schmidt, Fette und Seifen 54, 10 (1952).
15. H. P. Kaufmann, J. Budwig und C. W. Schmidt, Fette und Seifen 54, 73 (1952).
16. J. Spiteri und G. Nunez, C. R. 234, 2603 (1952).
17. Y. Inoue und M. Noda, J. Agr. Chem. Soc. Japan 18, 415 (1942), 18, 875 (1942), 23, 294 (1950), 23, 368 (1950), 24, 291 (1951), Bull. Agr. Chem. Soc. Japan 18, 33 (1942), 18, 72 (1942).
18. Y. Inoue und M. Noda, J. Agr. Chem. Soc. Japan 25, 496 (1952).
19. Y. Inoue und M. Noda, J. Agr. Chem. Soc. Japan 26, 634 (1952).

20. Y. Inoue und M. Noda, J. Agr. Chem. Soc. Japan 27, 50 (1953).
21. P. Savary, Bull. Soc. Chim. Biol. 36, 927 (1954).
22. V. Kobrle und R. Zahradnik, Chem. Listy 48, 1189 (1954).
23. V. Kobrle und R. Zahradnik, Chem. Listy 48, 1703 (1954).
24. G. Nunez, Thèse des Sciences, Paris, 1952.
25. G. Nunez und J. Spiteri, Bull. Soc. Chim. Biol. 35, 851 (1953).
26. P. F. Ceccaldi, R. Wegmann und J. Biez-Charreton, Bull. Soc. Chim. Biol. 36, 415 (1954).
27. R. Wegmann, P. F. Ceccaldi und J. Biez, Fette und Seifen 56, 159 (1954).
28. B. D. Ashley und K. Westphal, Arch. Biochem. 56, 1 (1955).
29. A. Holasek und K. Winsauer, Monatsh. 85, 796 (1954).
30. H. P. Kaufmann und W. H. Nitsch, Fette und Seifen 55, 787 (1953).
31. H. P. Kaufmann und W. H. Nitsch, Fette und Seifen 56, 151 (1954).
32. J. Boldingh, Experientia 4, 271 (1948), Rec. Trav. Chim. 69, 247 (1950).
33. F. Micheel und H. Schweppe, Angew. Chem. 66, 136 (1954).
34. Y. Inoue, M. Noda und O. Hirayama, J. Am. Oil Chem. Soc. 32, 132 (1955).
35. H. P. Kaufmann und J. Budwig, Fette und Seifen 52, 555 (1950).
36. H. P. Kaufmann, Fette und Seifen 52, 713 (1950).
37. H. P. Kaufmann und J. Budwig, Fette und Seifen 53, 69 (1951).
38. H. P. Kaufmann und J. Budwig, Fette und Seifen 53, 253 (1951).
39. H. P. Kaufmann und J. Budwig, Fette und Seifen 54, 7 (1952).
40. E. H. Ahrens jr. und L. C. Craig, J. biol. Chem. 195, 299 (1952).
41. T. P. Hilditch, «The Chemical Constitution of Natural Fats», London, S. 468 (1947).
42. H. Schmid und K. Schmid, Helv. Chim. Acta 36, 498 (1953).
43. R. W. Riemenschneider, J. Am. Oil Chem. Soc. 31, 518 (1954).
44. R. T. Holman und G. O. Burr, Arch. Biochem. 19, 474 (1948).
45. A. Linder, «Statistische Methoden für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure», Basel (1945).
46. J. F. Mead, G. Steinberg und D. R. Howton, J. Biol. Chem. 205, 683 (1953).
47. E. Klenk, Naturwiss. 41, 68 (1954).

CURRICULUM VITAE

Am 14. Mai 1925 wurde ich, Leo Abisch, staatenlos, als Sohn des Otto und der Toni Abisch-Sucher in Berlin geboren, wo ich bis zum Jahre 1938 die Volks- und Mittelschule besuchte. Anschliessend trat ich in die Realschule Basel ein, um schliesslich die letzten vier Klassen des Mathematisch-naturwissenschaftlichen Gymnasiums Basel zu besuchen, in welchem ich im Frühling 1944 die Maturitätsprüfung (Typus C) bestand. Anschliessend wandte ich mich an der philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel dem Chemiestudium zu und wählte in der Folge physikalische Chemie, Physik und Mathematik als Nebenfächer. Im Sommersemester 1948 war ich an der Universität Genf immatrikuliert. Bei folgenden Dozenten habe ich Vorlesungen und Praktika besucht: A. Baumgarten, K. Bernhard, M. Brenner, P. Buchner, F. Bürki, E. Cherbuliez, H. Dahn, H. Erlenmeyer, J. Gantner, C. Grob, P. Häberlin, H. Hediger, P. Huber, H. Kuhn, W. Kuhn, E. Mahler, E. Mason, K. H. Meyer, E. Miescher, A. Portmann, E. Probst, T. Reichstein, T. Reinhard, P. Ruggli, E. Salin, E. Schlittler, E. Sorkin, A. Speiser, B. P. Susz, Ch. Tamm, A. Toulmin, R. Wizinger, H. Zickendraht.

Seit dem Jahre 1951 arbeite ich im physiologisch-chemischen Institut der Universität Basel, wo die vorliegende Dissertation unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. K. Bernhard und unter Assistenz von Herrn Dr. H. Wagner entstand.

